

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А. А. Кузовкова<sup>1</sup>, О. Н. Вашкова<sup>1</sup>, Л. С. Ивашкевич<sup>1</sup>, В. М. Ёршик<sup>3</sup>, О. А. Ёршик<sup>2</sup>

## МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕНАЛИДОМИДА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

<sup>1</sup>Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Совместное общество с ограниченной ответственностью «НатиВита»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Разработана быстрая и чувствительная методика определения массовой концентрации леналидомидов в воздухе рабочей зоны, основанная на концентрировании леналидомидов из воздуха на бумажные беззольные фильтры «синяя лента», экстракции его из фильтров деионизированной водой под действием ультразвука и количественном определении леналидомидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детекцией при длине волны 210 нм. В качестве неподвижной фазы используется аналитическая колонка Hypersil Gold (Thermo Scientific) (длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм), в качестве подвижной фазы – смесь воды деионизированной с метанолом в соотношении 80:20 (об/об) со скоростью потока 0,4 см<sup>3</sup>/мин (изократический режим). Количественное определение выполняется методом абсолютной калибровки. Открываемость леналидомидов в воздухе рабочей зоны составляет 91,7% в диапазоне концентраций 0,001–0,050 мг/м<sup>3</sup> (при отборе 100 дм<sup>3</sup> воздуха). Предел количественного определения находится на уровне 0,001 мг/м<sup>3</sup>.*

**Ключевые слова:** леналидомид, воздух рабочей зоны, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-детектирование.

### ВВЕДЕНИЕ

Леналидомид — иммуномодулирующее лекарственное средство, которое обладает антиангиогенным и антинеопластическими свойствами. Первый дженерик из семейства иммуномодуляторов, влияющий на опухолевый ангиогенез. Согласно международным рекомендациям, он является препаратом первой линии лечения множественной миеломы, а также может быть применен во второй линии терапии при развитии резистентности/рецидиве [1]. Впервые на мировом рынке лекарственное средство появилось в 2007 году.

Леналидомид структурно сходен с талидомидом, известным тератогеном, но имеет лучший профиль безопасности и обладает более мощной иммуномодулирующей активностью. Несмотря на то что профиль токсичности леналидомидов изменен по сравнению с талидомидом, вещество, тем не менее, без врачебного назначения и контроля чрезвычайно опасно для человека. Его прием может оказывать

серьезные побочные эффекты на сердечно-сосудистую, эндокринную, пищеварительную, мочеполовую и дыхательные системы, а также на психику, органы кроветворения, органы чувств, обмен веществ, опорно-двигательный аппарат и кожные покровы. Леналидомид классифицируется как вещество, обладающее острой токсичностью для репродуктивной системы: очень высок риск развития врожденных дефектов у детей, если леналидомид применяется во время беременности [2]. Вследствие этого необходим контроль состояния воздушной среды при производстве данного лекарственного средства. Для осуществления контроля за содержанием леналидомидов в воздухе рабочей зоны требуется аттестованная высокочувствительная и селективная методика определения микроколичеств вещества.

Анализ литературных источников [3–19] показал, что в настоящее время существуют методики определения концентрации леналидомидов в фармацевтических

субстанциях, лекарственных препаратах, биологических жидкостях человека. Не найдено ни одной методики определения концентрации леналидомида в воздухе рабочей зоны. В большинстве из известных на сегодняшний день методик для качественного и количественного определения леналидомида используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [3–17] с различными способами детектирования: измерение оптического поглощения вещества в УФ-свете или его флуоресценции, а также масс-спектрометрия.

Цель работы – разработать высокочувствительную, селективную и метрологически аттестованную методику определения концентрации леналидомида в воздухе рабочей зоны с использованием ВЭЖХ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение массовой концентрации леналидомида в воздухе рабочей зоны выполняли методом косвенных измерений. Принцип разработанной методики основан на концентрировании леналидомида из воздуха на бумажные беззольные фильтры «синяя лента» MN 640 d (диаметром 70 мм, № 42с, Macherey-Nagel, Германия), экстракции его из фильтров 10 см<sup>3</sup> деионизированной водой под действием ультразвука (баня ультразвуковая Bandelin Sonorex RK 52H, ультразвуковая частота 35 кГц, (Sonorex, Германия)) в течение 5 мин, идентификации и количественном определении леналидомида методом ВЭЖХ при 210 нм (хроматограф жидкостный Finnigan Surveyor, оснащенный матричным фотодиодным детектором PDA Plus (Thermo Scientific, США), диапазон длин волн 190–800 нм). Неподвижной фазой являлась колонка Hypersil Gold (250×4,6 мм, 5 мкм, температура термостата колонки 40°C) с предколонкой Hypersil Gold Drop-in Guard (10×4,6 мм, 5 мкм). Подвижной фазой выступала смесь метанола с водой в соотношении 20:80 (о:о) при скорости потока 0,4 см<sup>3</sup>/мин (изократический режим элюирования).

Метанол (HPLC grade, Panreac Quimica SAU, Испания), ацетонитрил (HPLC grade, Carlo Erba, Италия), воду деионизированную, 2 мМ аммония формат, использованные при приготовле-

нии различных подвижных фаз, фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Agilent Technologies, США) и дегазировали с помощью вакуумной фильтровальной установки DURAN, подключенной к вакуумному насосу Rocker 300 (Rocker Scientific (Тайвань)). Для получения воды деионизированной с удельным сопротивлением не менее 18,2 МОм/см, удельной электропроводностью не более 0,056 мкСм/см использовали прибор Barhstead Easy Pure II (Thermo Scientific).

При выборе диапазона концентраций стандартного раствора вещества, по которому производится градуировка хроматографа, обычно руководствуются правилом: нижняя граница диапазона должна составлять не менее 0,5 предельно допустимой концентрации (ПДК) вещества в объекте, верхняя граница – не более 2 ПДК вещества в объекте. Поскольку для леналидомида в воздухе рабочей зоны не определены нормативные показатели, но токсикологами была указана необходимая чувствительность методики, равная 0,001 мг/м<sup>3</sup>, в выборе нижней границы диапазона концентраций стандартного раствора вещества руководствовались данным показателем. В качестве аналитического стандарта использовали леналидомид с содержанием вещества 99,8% (Natco Pharma Limited, Индия). Для определения линейного диапазона детектирования леналидомида, а также построения градуировочного графика были приготовлены его следующие стандартные растворы: основной раствор в ацетонитриле в концентрации 100 мкг/см<sup>3</sup>, рабочий раствор в воде деионизированной в концентрации 1 мкг/см<sup>3</sup>, градуировочные растворы в воде деионизированной в концентрациях 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 и 0,01 мкг/см<sup>3</sup>. Параметры градуировочной характеристики рассчитывали методом наименьших квадратов.

При метрологической аттестации методики устанавливали показатели прецизионности и правильности. Показатели прецизионности (повторяемости и промежуточной прецизионности с двумя изменяющимися факторами «время + оператор») определяли в соответствии с СТБ ИСО 5725-2-2002 [20], используя метод «введено-найденно». В связи с технической невозможностью провести экспери-

мент для адекватной оценки показателей прецизионности непосредственно в пробах воздуха рабочей зоны статистические данные получены по результатам анализа бумажных беззольных фильтров с нанесенным раствором леналидомида (далее – образцы для исследования). Получено 3 уровня концентраций ( $j = 3$ ), характеризующих нижнюю границу, середину и верхнюю границу диапазона измерений методики. Для каждого уровня  $j$  ( $j = 3$ ) в условиях промежуточной прецизионности с двумя изменяющимися факторами «время + оператор» проведено по 15 определений ( $p = 15$ ). Каждое определение включало 2 единичных результата испытаний ( $n = 2$ ), полученных в условиях повторяемости. Оценка относительной стандартной неопределенности осуществляли согласно СТБ ИСО 5725-4-2002 [21]. Открываемость леналидомида по разработанной методике изучали в процессе внутрилабораторных исследований в условиях повторяемости путем анализа проб с известной добавкой леналидомида. Было проведено 15 определений, выполненных в условиях повторяемости.

Значение открываемости ( $R$ , %) в воздухе находили по формуле:

$$R = (\text{найденно аналита} / \text{введено аналита}) \times 100\%, \quad (1)$$

где «найденно аналита» – концентрация леналидомида, экстрагируемая из фильтра и обнаруженная с помощью разработанной методики; «введено аналита» – концентрация леналидомида, внесенная на фильтр ( $\text{мг}/\text{м}^3$ ).

Концентрацию леналидомида в пробах воздуха рабочей зоны ( $X_{np}$ ,  $\text{мг}/\text{м}^3$ ) определяли по формулам:

$$X_{np1} = \frac{C_1 \times V}{V_1}, \quad (2)$$

$$X_{np2} = \frac{C_2 \times V}{V_1}, \quad (3)$$

где  $C_1, C_2$  – концентрации леналидомида, найденные по градуировочному графику,  $\text{мкг}/\text{см}^3$ ;

$V$  – объем смеси, которым проводится

экстракция препарата из фильтра,  $\text{см}^3$ ;

$V_1$  – объем воздуха, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям (давление – 101,325 кПа, температура – 293,16 К),  $\text{дм}^3$ , который рассчитывается по формуле:

$$V_1 = \frac{V_t \times 293,16 \times P}{(273,16 + t) \times 101,325}, \quad (4)$$

где  $V_t$  – объем исследуемого воздуха,  $\text{дм}^3$ ;

101,325 кПа – давление в кПа, равное 760 мм рт. ст.;

$P$  – барометрическое давление во время отбора пробы, кПа;

$T$  – температура воздуха во время отбора пробы,  $^{\circ}\text{C}$ ;

293,16 – температура в Кельвинах, равная  $20^{\circ}\text{C}$ ;

273,16 – температура в Кельвинах, равная  $0^{\circ}\text{C}$ .

За результат анализа принимали среднее арифметическое значение концентрации, найденное по результатам двух параллельных измерений.

Предел количественного определения (*limit of quantitative detection, LQD*) ( $\text{мкг}/\text{см}^3$ ) для водного стандарта леналидомида был принят как равный его концентрации в минимальной точке градуировочного графика.

Диапазон определяемых концентраций ( $\text{мг}/\text{м}^3$ ) леналидомида в воздухе рабочей зоны рассчитанный, исходя из установленной токсикологами минимальной обнаруживаемой концентрации вещества ( $0,001 \text{ мг}/\text{м}^3$ ) и максимальной концентрации.  $LQD$  леналидомида в воздухе рабочей зоны ( $\text{мг}/\text{м}^3$ ), был принят как равный минимальной обнаруживаемой концентрации.

Если полученное среднее значение концентрации леналидомида ( $\bar{X}$ ) меньше нижней границы его диапазона измерения, то концентрации леналидомида в воздухе рабочей зоны представляли в виде:

$$\bar{X} < LQD, \quad (5)$$

где  $LQD$  – нижняя граница диапазона измерения леналидомида.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разделения леналидомида с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в качестве неподвижной фазы использовали колонку, заполненную сорбентом на основе силикагеля с радикалом *n*-октадецилом (C18) – Hypersil Gold (Thermo scientific) длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм. В качестве защитной применяли колонку Hypersil Gold Drop-in Guard (Thermo scientific) длиной 10 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм. C18-колонки использовали и другие авторы методик определения концентраций леналидомида в фармацевтических субстанциях, лекарственных препаратах и биологических жидкостях [3–11, 22]. Применение колонки Hypersil Gold в разработанных условиях позволило получить аналитический сигнал (хроматографический пик леналидомида) с наибольшей величиной (площадью пика) и симметричной формы. Также оценивали возможности колонки Eclipse XDB-C18 (Agilent) длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм. Данная колонка, как и колонка Hypersil Gold, относится к C18-колонкам, однако полученный на ней при тех же условиях хроматографический пик леналидомида был несимметричным и меньшим по площади, чем при использовании Hypersil Gold.

Температура термостата колонки в методиках [3–11, 22] варьировала от 25°C до 40°C. В методике, предложенной нами, термостат колонки устанавливается на 40°C. Данная температура позволяет снизить вязкость подвижной фазы на основе смеси воды и метанола, что в свою очередь уменьшает рабочее давление в колонке и увеличивает срок ее службы.

В качестве подвижной фазы оценивали следующие варианты: 1) смесь воды с метанолом [22]; 2) смесь метанола с ацетонитрилом [6]; 3) смесь 2 мМ аммония формиата с ацетонитрилом [10, 11] и 4) смесь калий-фосфатного буфера с ацетонитрилом и/или метанолом [3, 4, 7, 9]. Как показали результаты наших исследований, наилучшей оказалась подвижная фаза на основе воды и метанола в соотношении 80:20 по объему в совокупности с изократическим режимом элюирования

[22]. В процессе разработки методики устанавливали оптимальную скорость потока данной подвижной фазы: оценивали скорость 0,4; 0,5 и 0,6 см<sup>3</sup>/мин. Как результат была выбрана скорость прохождения элюента через хроматографическую колонку, равная 0,4 см<sup>3</sup>/мин, поскольку при таком условии хроматографический пик леналидомида выходил после всех дополнительных пиков.

Определяя длину волны детектирования леналидомида, руководствовались его спектром с максимумом в 210 нм. Также оценивали длины волн 215, 220 и 240 нм, так как они были рекомендованы авторами методик определения концентраций леналидомида в фармацевтических субстанциях, лекарственных препаратах, спинномозговой жидкости и плазме крови [5, 7–11, 22]. Однако детекция при данных длинах волн не показывала максимальных значений поглощения леналидомида, особенно при 240 нм – высота пика почти в 3 раза ниже, чем при 210 нм, что не позволило определить концентрации вещества на уровне 0,001–0,01 мкг/см<sup>3</sup>.

Линейность методики при разработанных условиях хроматографирования оценивали на 5-ти уровнях концентраций леналидомида в воде (0,01; 0,05; 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/см<sup>3</sup>) в 5 сериях. На рисунке 1 представлена зависимость площади пика (*y*) от концентрации леналидомида (*x*) при  $\lambda = 210$  нм, соответствующая уравнению  $y = 2374654,828 \times x - 1803,879$ . Коэффициент корреляции составил более 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций.

Линейный диапазон детектирования леналидомида в водных стандартах составил 0,01–0,5 мкг/см<sup>3</sup>. Предел количественного определения (*LQD*) для водного стандарта леналидомида – 0,01 мкг/см<sup>3</sup>.

Градуировочный график строили только с использованием водных растворов леналидомида. Линейность методики с применением водного экстракта (матрицы) из фильтра не исследовали, так как при установленных методических условиях не наблюдали никакого мешающего «эффекта матрицы», как это бывает при анализе сложных матриц, таких как растительные материалы, почва, продукты питания.

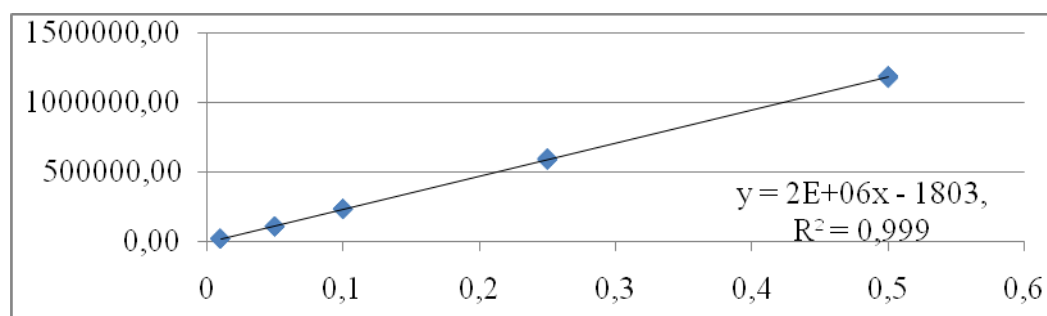


Рисунок 1. – Градуировочный график, отражающий зависимость среднего значения площади пика на хроматограммах (y, мА) от концентрации леналидомида в растворе (x, мкг/см³)

На рисунке 2 представлена хроматограмма стандартного раствора леналидомида в минимальной (0,01 мкг/см³), на рисунке 3 – в максимальной (0,5 мкг/см³) концентрации из градуировочного графика.

Средние значения площадей пиков градуировочных растворов леналидомида и их относительных стандартных отклонений (RSD) для двух последовательных хроматограмм приведены в таблице 1. Как видно из полученных результатов, RSD не превысило 1,7 %.

На хроматографической стальной колонке Hypersil Gold (длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение 5 мкм), термостатируемой при температуре 40°C, и подвижной фазе, представляющей собой смесь метанола и воды деионизированной в объемном соотношении 20:80 и проходящей через колонку со скоростью 0,4 см³/мин, время удерживания стандартного раствора леналидомида (при вводе 0,025 см³) составило 15,9±0,1 мин (детекция при 210 нм). RSD времени удерживания равно 0,463%.

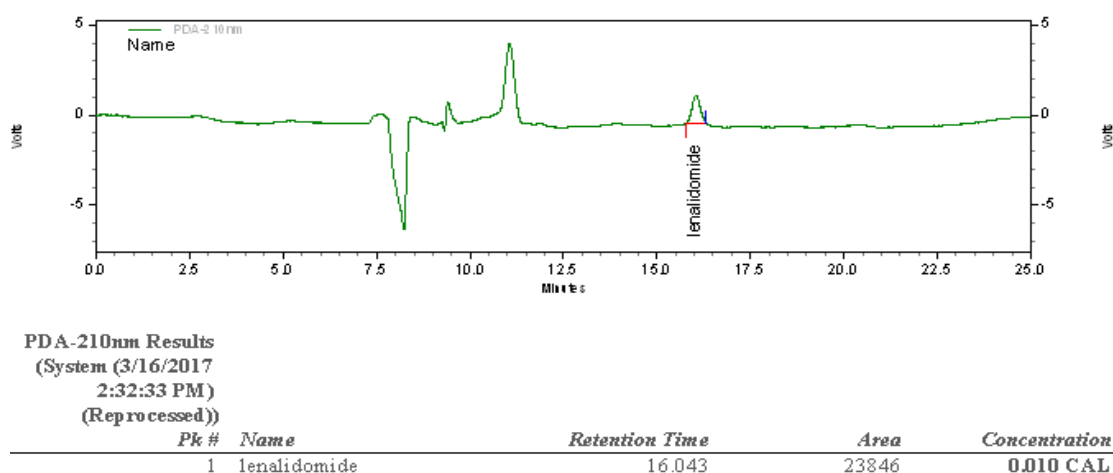


Рисунок 2. – Хроматограмма градуировочного стандартного раствора леналидомида в концентрации 0,01 мкг/см³

Таблица 1. – Средние значения площадей пиков градуировочных растворов леналидомида и их относительных стандартных отклонений для двух последовательных хроматограмм (для каждой концентрации n=10 (5 серий))

Градуировочная концентрация, мкг/см³	Среднее значение площади пика, мА	Среднее значение RSD для двух последовательных хроматограмм одной точки градуировки, %
0,01	24063	1,7
0,05	111907	0,4
0,1	237622	0,5
0,25	593607	0,3
0,5	1184718	0,2

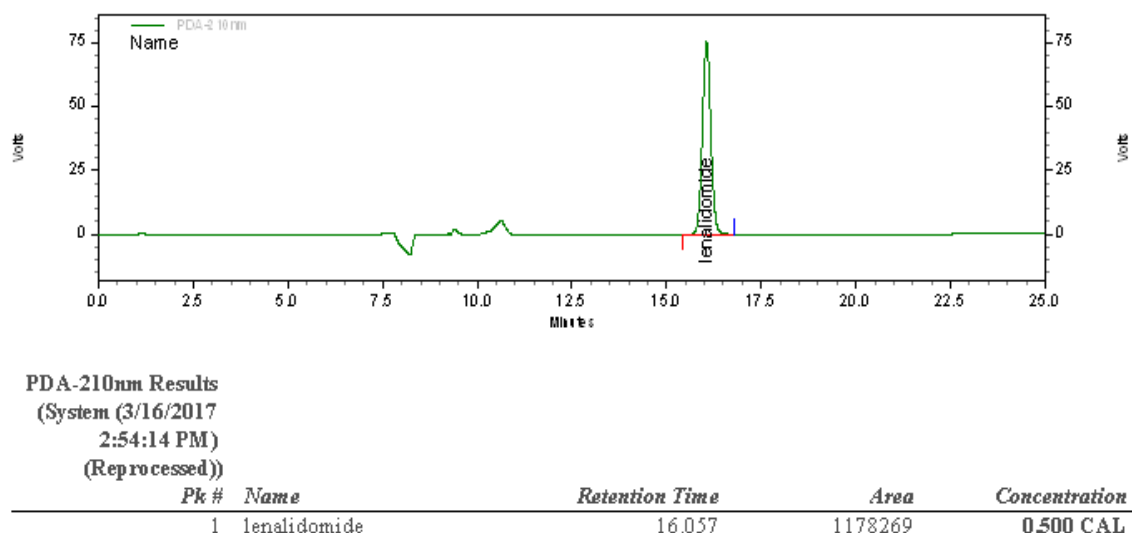


Рисунок 3. – Хроматограмма градуировочного стандартного раствора леналидомида в концентрации 0,5 мкг/см<sup>3</sup>

Специальные фильтры, в том числе и мелкопористые марки «синяя лента», в качестве сорбентов для действующих веществ лекарственных препаратов широко используются учреждениями санитарного надзора при контроле за качеством воздуха рабочей зоны (например в методиках [23–26]). Нами также был выбран данный способ отбора проб воздуха рабочей зоны, т.к. по сравнению с другими он прост, эффективен и доступен.

В разработанной нами методике воздух с объемным расходом 10 дм<sup>3</sup>/мин аспирируют через бумажный фильтр «синяя лента», помещенный в фильтродержатель, в течение 10 мин. Для измерения концентрации вещества на уровне установленного нами *LQD* (0,001 мг/м<sup>3</sup>) необходимо отобрать 100 дм<sup>3</sup> воздуха (0,1 м<sup>3</sup>). В одной точке должно быть отобрано не менее двух проб. Одновременно должны быть измерены температура, давление и влажность воздуха в месте отбора пробы. Фильтры с отобранными пробами воздуха помещают в бюксы с притертой пробкой.

Сроки хранения фильтров с отобранными пробами воздуха устанавливали

экспериментально. В 12 образцов (фильтров «синяя лента») вносили по 5 мкг леналидомида (500 мм<sup>3</sup> водного раствора леналидомида в концентрации 10 мкг/см<sup>3</sup>, приготовленного из основного стандартного раствора). Для тестирования каждого срока хранения использовали по 3 фильтра. Фильтры высушили на воздухе при комнатной температуре и хранили при температуре –18°C. Анализировали экстракты леналидомида из свежеприготовленных фильтров, а также из фильтров после хранения в течение 24, 48 и 72 ч. Экстракцию леналидомида из фильтров проводили, как описано ниже. В таблице 2 представлены средние значения открываемости леналидомида из исследуемых фильтров.

Статистический анализ полученных данных показал, что различие между средними значениями открываемости в различных временных точках не является случайным. Следовательно, фактор «время хранения» влияет на значение открываемости. Таким образом, нельзя хранить фильтры с отобранными пробами воздуха при температуре –18°C дольше, чем 24 ч.

Таблица 2. – Открываемость леналидомида из фильтров при хранении при температуре –18°C (n=6 для каждой временной точки)

Время хранения, ч	Среднее значение открываемости, %	RSD открываемости, %
0	91,7	1,4
24	83,2	1,3
48	83,3	1,0
72	83,5	1,0

В течение суток после отбора проб должна быть проведена их первичная подготовка к анализу.

В ходе исследований был разработан способ извлечения леналидомида из воздуха рабочей зоны, включающий в себя нижеописанный этап экстракции препарата из бумажного фильтра. В качестве экстрагента используется вода деионизированная. Фильтры с отобранной пробой воздуха разрезают на полоски размером приблизительно 0,5 см, помещают в пробирки из полипропилена с винтовой крышкой объемом 10 см<sup>3</sup>, приливают 10 см<sup>3</sup> воды деионизированной. Пробирки аккуратно встряхивают до полного смачивания бумажных полосок. Пробирки в штативе помещают в ультразвуковую баню на 5 мин. Затем пробирки снова встряхивают в течение 10 сек. Экстракт переносят в виалу и анализируют при условиях хроматографирования, указанных выше.

Необходимая кратность экстракций была установлена в эксперименте по определению открываемости леналидомида из бумажных фильтров. Тестирова-

ли одно-, двух- и трехкратную экстракцию. Для проведения каждого типа экстракции было приготовлено по 3 образца (фильтра). В каждый образец вносили по 5 мкг леналидомида (500 мм<sup>3</sup> водного раствора леналидомида в концентрации 10 мкг/см<sup>3</sup>, приготовленного из основного стандартного раствора). Фильтры высушивали на воздухе при комнатной температуре. Подготовку образцов для однократной экстракции проводили согласно схеме, описанной выше. Для осуществления двукратной экстракции сначала проводили операции, необходимые для однократной экстракции, затем полученный экстракт собирали в стакан и снова проводили экстракцию по вышеописанной схеме. В конце смешивали два экстракта, переносили 1 см<sup>3</sup> полученной смеси в виалу для хроматографирования. Для проведения трехкратной экстракции действия, необходимые для однократной экстракции, повторяли трижды. Открываемость леналидомида при одно-, дву- и трехкратной водной экстракции из фильтров представлена в таблице 3.

Таблица 3. – Открываемость леналидомида при одно-, дву- и трехкратной водной экстракции из фильтров (n=6 для каждого типа экстракции)

Тип экстракции	Среднее значение открываемости, %	Стандартное отклонение для открываемости, %
Однократная	91,7	1,2
Двукратная	94,3	2,3
Трехкратная	95,1	3,6

Поскольку при одно-, двух- и трехкратной экстракции открываемость вещества с учетом величины стандартного отклонения была практически одинаковой, посчитали целесообразным использовать однократную экстракцию, поскольку уже повторная экстракция увеличивает в 2 раза объем экстракционной смеси и, соответственно, в 2 раза уменьшает чувствительность методики (или требуется концентрирование образца, что усложняет методику).

Для установления сроков хранения полученные экстракты из фильтров с введенными 5 мкг леналидомида помещали в холодильник при температуре 2–8°C и анализировали спустя 24 и 48 ч. Полученные результаты представлены в таблице 4. Их статистический анализ показал, что различие между средними значениями количества леналидомида в различных временных точках является случайным, следовательно, исследуемый фактор «время хра-

Таблица 4. – Количество леналидомида в экстрактах из фильтров при хранении при температуре 2–8°C (n=6 для каждой временной точки)

Введенное на фильтр количество леналидомида, мкг	Время хранения, ч	Обнаруженное количество леналидомида, мкг	Стандартное отклонение, мкг
5	0	4,59	0,07
	24	4,60	0,04
	48	4,59	0,05



нения» не влияет на значение количества леналидомида. Таким образом, экстракты из фильтров можно хранить при температуре 2–8°C в течение, как минимум, 48 ч.

Специфичность методики оценивали по времени удерживания пика леналидомида, экстрагированного из бумажных фильтров, в сравнении с временем удерживания пика водного стандарта леналидомида. Пик леналидомида, экстрагированного из бумажных фильтров, имел практически то же время удерживания ( $16,1 \pm 0,1$  мин), что и пик водных стандартов леналидомида ( $15,9 \pm 0,1$  мин) (различие составляет 1,3%). Анализ хроматограммы «холостой» пробы (водного экстракта из пустого фильтра) показал отсутствие хроматографических пиков со временем удерживания леналидомида. Коэффициент асимметрии пика леналидомида, характеризующий надежность определения границ пика, равен 1 (определено по пику леналидомида, экстраги-

руемого из фильтра с внесенным количеством аналита 5 мкг (рекомендуемое значение коэффициента асимметрии от 0,8 до 1,5).

Поскольку токсикологами была указана необходимая чувствительность методики, равная  $0,001 \text{ мг/м}^3$ , нами данное значение было выбрано в качестве предела количественного обнаружения в воздухе рабочей зоны ( $LQD$ ) и более низкие значения мы не тестировали. Диапазон определяемых концентраций леналидомида в воздухе рабочей зоны составил  $0,001\text{--}0,050 \text{ мг/м}^3$ . Типичная хроматограмма экстракта из фильтра, содержащего леналидомид в минимальной обнаруживаемой концентрации в пересчете на воздух  $0,001 \text{ мг/м}^3$ , представлена на рисунке 4.

В соответствии с СТБ ИСО 5725 [20, 21] были установлены предел повторяемости и предел промежуточной прецизионности разработанной методики (таблица 5).

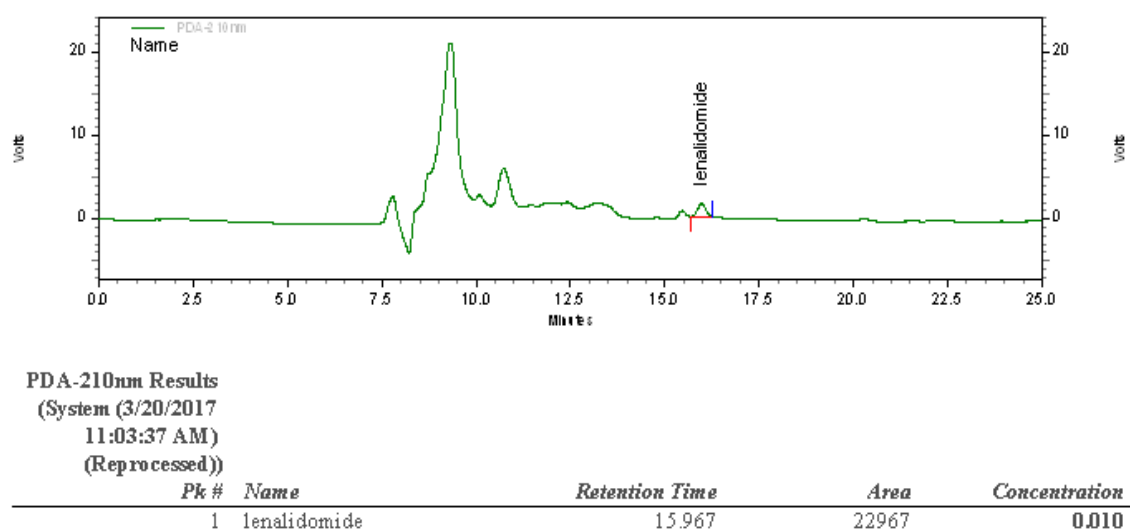


Рисунок 4. – Типичная хроматограмма экстракта из фильтра, содержащего леналидомид в минимальной обнаруживаемой концентрации в пересчете на воздух  $0,001 \text{ мг/м}^3$

Таблица 5. – Диапазон измерений концентрации леналидомида в воздухе рабочей зоны, значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, максимальной расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности  $P = 0,95$

Диапазон измерений, $\text{мг/м}^3$	Показатель повторяемости, %	Предел повторяемости, %	Показатель промежуточной прецизионности, %	Предел промежуточной прецизионности, %	Максимальная расширенная относительная неопределенность, %
от 0,001 до 0,05	9,30	26,04	9,70	27,16	36,10



### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана высокочувствительная и метрологически аттестованная методика выполнения измерений (МВИ) массовой концентрации лекарственного средства леналидомида в воздухе рабочей зоны. Принцип данной МВИ основан на концентрировании леналидомида из воздуха на бумажные беззольные фильтры «синяя лента», экстракции его из фильтров деионизированной водой под действием ультразвука, идентификации и количественном определении леналидомида методом ВЭЖХ при 210 нм. Неподвижной фазой является колонка Hypersil Gold (40°C). Подвижной фазой выступает смесь метанола с водой в соотношении 20:80 по объему при скорости потока 0,4 см<sup>3</sup>/мин (изократический режим элюирования). Нижний предел количественного определения исследуемого лекарственного препарата в воздухе составляет 0,001 мг/м<sup>3</sup>. Экстракцию леналидомида из фильтров с отобранными пробами воздуха следует проводить в день отбора.

### SUMMARY

A. A. Kuzovkova, O. N. Vashkova,  
L. S. Ivashkevich, V. M. Ershik, O. A. Ershik  
DETERMINATION METHOD  
OF LENALIDOMIDE CONCENTRATION  
IN WORKING AIR

A rapid and sensitive determination method of lenalidomide mass concentration in the working air has been developed based on concentrating of lenalidomide from the air to paper ashless filters "blue ribbon", extracting it from the filters by deionized water under ultrasound and quantifying lenalidomide by high-performance liquid chromatography with UV detection at wavelength of 210 nm. A Hypersil Gold (Thermo Scientific) analytic column (250 mm length, 4,6 mm inner diameter, 5 µm grain size) is used as a stationary phase, and a mixture of deionized water with methanol in a ratio of 80:20 (v/v) (isocratic elution mode)) at a flow rate of 0,4 cm<sup>3</sup>/min is used as a mobile phase. Quantification is carried out by the absolute calibration method. Lenalidomide recovery in working air is 91,7% for 0,001–0,050 mg/m<sup>3</sup> in concentration range (when sampling 100 dm<sup>3</sup> of air). The limit of quantitative determination is at the

level of 0,001 mg/m<sup>3</sup>.

Keywords: lenalidomide, working air, high-performance liquid chromatography, UV detection.

### ЛИТЕРАТУРА

1. The efficacy of lenalidomide combination therapy in heavily pretreated non-Hodgkin lymphoma patients: an Italian observational, multicenter, retrospective study / P. L. Ziznani [et al.] // *Leukemia and Lymphoma*. – 2016. – Vol. 58, № 1. – P. 226–229.
2. Lenalidomide [Electronic resource] // PubChem. Open chemistry database, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. – Mode of access: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/216326>. – Date of access: 05.04.2017.
3. Development of an HPLC Assay Method for Lenalidomide / G. Saravanan [et al.] // *Chromatographia*. – 2007. – Vol. 66, № 3. – P. 287–290.
4. Reddy, L. M. Development of a Rapid and Sensitive HPLC Assay Method for Lenalidomide Capsules and Its Related Substances / L. M. Reddy, K. J. Reddy, L. B. Reddy // *E-Journal of Chemistry*. – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 1165–1174.
5. Pocha, K. Development of enantioselective assay and evaluation of pharmacokinetic properties of lenalidomide by HPLC and LC-MS/MS: dissertation of Ph. D / K. Pocha. – Guntur, 2011. – 183 p.
6. Swetha, S. New RP-HPLC method development and validation for the estimation of assay and related substances of lenalidomide in bulk and dosage / S. Swetha, B. M. Ishaq, H. A. Ahad // *Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 8, № 2. – P. 1173–1177.
7. New antimyeloma drugs in spinal cord infiltration for multiple myeloma. Determination of lenalidomide in cerebrospinal fluid with ultrasensitive high-performance liquid chromatography / I. Rapado [et al.] // *Modern Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 11–13.
8. Alzoman, N. Z. A Validated Stability-Indicating and Stereo selective HPLC Method for the Determination of Lenalidomide Enantiomers in Bulk Form and Capsules / N. Z. Alzoman // *Journal of Chromatographic Science*. – 2016. – Vol. 1, № 6. – P. 1–6.
9. Degradation studies of highly po-

tent and life threatening human birth defect drug – lenalidomide by HPLC and LC-MS / N. S. Raghu [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 2010. – Vol. 33. – P. 654–679.

10. HPLC method for detecting lenalidomide: pat. WO2011064574A1 [Electronic resource] // PATENTSCOPE. Search International and National Patent Collections. – Mode of access: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011064574>. – Date of access: 15.04.2017.

11. Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for the determination of a fluorinated analogue of thalidomide, N-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-3,4,5,6-tetrafluorophthalamic acid, and lenalidomide / K. Pather [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2011. – Vol. 34. – P. 83–92.

12. Trace determination of lenalidomide in plasma by non-extractive HPLC procedures with fluorescence detection after precolumn derivatization with fluorescamine / N. Y. Khalil [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2013. – Vol. 7, № 52. – P. 1–7.

13. Rozewski, D. M. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Lenalidomide in Mice / D. M. Rozewski // *The AAPS Journal*. – 2012. – Vol. 14, № 4. – P. 872–882.

14. Development and validation of LC-MS/MS method for the quantitation of lenalidomide in human plasma using Box-Behnken experimental design / M. S. Hasnain [et al.] // *Analyst*. – 2013. – Vol. 138, № 5. – P. 1581–1588.

15. LC-MS/MS method for simultaneous determination of thalidomide, lenalidomide, cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone and dexamethasone in serum of multiple myeloma patients / Ch. Shu [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2016. – № 1028. – P. 111–119.

16. Development and validation of ultra-performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometry for determination of lenalidomide in rabbit and human plasma / M. Iqbal [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2013. – Vol. 7, № 7. – P. 1–9.

17. Gopinath, Sh. Development and Validation of a Rapid and Sensitive Assay for Simultaneous Quantification of Lenalidomide and Dexamethasone in Human Plasma by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass-Spectrometry / Sh. Gopinath, R. S. Kumar, S. Alexander // *Current Phar-*

*maceutical Analysis*. – 2011. – № 7. – P. 240–247.

18. A highly sensitive fluorimetric method for determination of lenalidomide in its bulk form and capsules via derivatization with Fluorescamine / I. A. Darwish [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2012. – Vol. 6, № 118. – P. 1–7.

19. New spectrophotometric methods for estimation of lenalidomide in pharmaceutical formulations / B. S. Sastry [et al.] // *International Journal of PharmTech*. – 2009. – Vol. 1, № 3. – P. 416–419.

20. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений : СТБ ИСО 5725–2–2002. – Введ. 2003–07–01. – Минск : БелГИСС, 2003. – 56 с.

21. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода определений: СТБ ИСО 5725–4–2002. – Введ. 2003–07–01. – Минск : БелГИСС, 2003. – 32 с.

22. Raw material test procedure / Natco Pharma Limited. – Kothur, 2016. – 18 p.

23. Методические указания по флуориметрическому измерению концентраций ацетилсалициловой (2-ацетилоксобензойной) кислоты (аспирина) в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]: МУ 5099–89. – Введ. 1989–09–28 // Электронный фонд правовой и научно-технической информации. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200043467>. – Дата доступа: 15.04.2017.

24. Методические указания по спектрофотометрическому суммарному измерению концентрации рибофлавина-5'-фосфата моноватриевой соли дигидрата (рибофлавина моноватриевой соли) и рибофлавина-5'-фосфата (рибофлавина фосфата) в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]: МУК 4.1.853–99. – Введ. 1999–12–31 // Электронный фонд правовой и научно-технической информации. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200049537>. – Дата доступа: 15.04.2017.

25. Измерение концентраций аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]:

МУК 1.0.409–96. – Введ. 1996–06–08 // Сайт «Охрана труда в России». – Режим доступа: [https://www.ohranatruda.ru/ot\\_biblio/normativ//data\\_normativ/41/41931/index.php](https://www.ohranatruda.ru/ot_biblio/normativ//data_normativ/41/41931/index.php). – Дата доступа: 16.04.2017.

26. Фотометрические измерение концентрации парацетамола (4-ацетиламинофенола) в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]: МУК 4.1.0.315–96. – Введ. 1996–06–08 // Электронный фонд правовой и научно-технической информации. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200026620>. – Дата доступа: 16.04.2017.

27. Спектрофотометрическое измерение концентрации 1-метил-2-фенилтиометил-3-карбэтокси-4-диметиламинометил-5-окси-6-броминдола гидрохлорида (арбидола ги-

дрохлорида) в воздухе рабочей зоны [Электронный ресурс]: МУК 4.1.0.504–96. – Введ. 1996–06–08 // Электронный фонд правовой и научно-технической информации. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200036579>. – Дата доступа: 16.04.2017.

**Адрес для корреспонденции**

220012, Республика Беларусь

г. Минск, ул. Академическая, 8,

Республиканское унитарное предприятие

«Научно-практический центр гигиены»,

лаборатория хроматографических исследований,

[annalenets.kuzovkova@gmail.com](mailto:annalenets.kuzovkova@gmail.com),

тел. раб. +375 (17) 2841573,

Кузовкова А. А.

Поступила 28.04.2018 г.